



TITLE:

# STUDIES ON THE STRUCTURE AND FUNCTION OF THE NOVEL ISOFORM OF TRYPSIN( Abstract\_要 旨 )

AUTHOR(S):

CORNELIO, NYARUHUCHA

---

CITATION:

CORNELIO, NYARUHUCHA. STUDIES ON THE STRUCTURE AND FUNCTION OF THE NOVEL  
ISOFORM OF TRYPSIN. 京都大学, 1997, 博士(農学)

ISSUE DATE:

1997-03-24

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/202384>

RIGHT:

氏 名	コルネリオ ニヤルフチャ CORNELIO NYARUHUCHA
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 919 号
学位授与の日付	平成 9 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	農 学 研 究 科 食 品 工 学 専 攻
学位論文題目	STUDIES ON THE STRUCTURE AND FUNCTION OF THE NOVEL ISOFORM OF TRYPSIN (新規トリプシンアイソフォームの構造と機能に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 鬼 頭 誠 教 授 井 上 國 世 教 授 伏 木 亨

### 論 文 内 容 の 要 旨

栄養素の消化・吸収にとって必須な消化酵素分子のほとんどは膵臓の腺房細胞で合成され消化管へ分泌される。もっとも代表的なヒト膵臓プロテアーゼであるトリプシンは、膵臓消化酵素群のなかで鍵酵素と呼ぶべき分子であるといえる。なぜなら生体組織自体がこれらの酵素の攻撃をうけないよう、膵消化酵素のほとんどは前駆体（プロ酵素）として合成・分泌され、消化管内で活性化されるが、この活性化はトリプシンによる特異的な限定加水分解によってはじめて実現されるからである。サザンハイブリダイゼーションによると、ヒトゲノムにはトリプシン遺伝子が少なくとも10コピー存在しているが、このうち遺伝子レベルおよびタンパク質レベルで解析されているのは、トリプシンⅠ型、Ⅱ型の2種類だけである。本論文では、トリプシンの新規アイソフォームを遺伝子レベルから検出することを試み、その結果、発現量はわずかではあるが、既知のトリプシンとはアミノ酸配列が一部異なる新規アイソフォームを発見した。組み換え体を作ってその性状を検討してみると、既知のトリプシンとは異なり、トリプシンインヒビターに抵抗性を示すことが判明した。

第1章では、ヒト膵臓 cDNA ライブラリーから、トリプシン関連 cDNA を系統的にスクリーニングしこれを分類して、これまで報告されていなかった新規トリプシンアイソフォームを同定した方法を述べ、この cDNA の全一次配列を報告し、既知のトリプシンとの構造上の異同を論じた。さらに大腸菌のペリプラズムで組み換え体トリプシンの発現を行い、活性を有する新規トリプシンアイソフォームの精製に成功したことを述べた。この標品を用いて、酵素学的諸性質を検討したところ、既知のトリプシンとは際だって異なる性質を見出した。すなわち、新規トリプシンアイソフォームは、既知のトリプシンを100%阻害するに足る濃度のタンパク性トリプシンインヒビターにはほとんど阻害されないという、顕著なインヒビター抵抗性を有することを明らかにした。この特性の機構を調べるため、新規トリプシンアイソフォームとタンパク性トリプシンインヒビターとの分子的相互作用をゲル濾過カラムで検討した。その結果、両分子は安定な複合体を形成しえないことが確かめられた。X線解析データを元にしたコンピュータシ

ミュレーションを用いて、タンパク質立体構造からこの特性を説明することを試みた。その結果、活性中心近傍に位置する198番目の残基が、一般のトリプシンでは Gly であるのに対し、新規トリプシンアイソフォームでは、Arg 置換されていることによる立体構造上の特性が、新規トリプシンアイソフォームのインヒビター抵抗性に大きく寄与している可能性が示唆された。

第2章では、インヒビター抵抗性を示すヒト・トリプシンアイソフォームの生物学的意義を究明することを目的として、モデル実験動物において同様のアイソフォームを同定し、実験モデルを確立することを目的とした。その結果、ラットにも、インヒビター抵抗性を示すトリプシンアイソフォーム、P23 が発現していることを突き止めた。大腸菌における P23 組み換え体の生産を行い、精製標品を取得した。これを用いて、各種インヒビターによる阻害実験を行ったところ、ヒトのアイソフォームと同様、大豆トリプシンインヒビター (SBTI)、膵臓分泌型トリプシンインヒビター (PSTI) などのタンパク性インヒビターに対して顕著な抵抗性を示すことを明らかにした。

第3章では、ラット膵臓から調製した消化酵素前駆体を用いた *in vitro* 実験系を確立してインヒビター抵抗性を示すトリプシンの生理的存在意義について検討を加えた。インヒビター抵抗性トリプシンは、摂取した食品中にトリプシン阻害物質が含まれている場合、栄養素の消化を円滑に行うため有利と考えられるが、他方、膵臓細胞内で、インヒビター抵抗性トリプシンが活性化すれば、他の消化酵素前駆体が次々と活性化され、膵炎を引き起こす危険性も予測されるからである。

インヒビター抵抗性トリプシンを含まない消化酵素前駆体混合液に、微量 (0.4重量%) のトリプシン I 型を添加してインキュベートした場合、活性化はほとんど生じなかった。これは、酵素前駆体と共存する膵臓分泌型トリプシンインヒビター (PSTI) による防御反応と考えられた。一方、消化酵素前駆体混合液に、インヒビター抵抗性トリプシンを添加する (0.4重量%) と、消化酵素前駆体は顕著に活性化され、PSTI による防御が有効に働かないことが示された。通常のラット膵臓中におけるインヒビター抵抗性トリプシンの存在量は 0.1重量%程度と定量されるが、食餌条件によっては変動し、さらにアルコールなどの活性化誘発因子が摂取された場合、インヒビター抵抗性トリプシン膵炎を促進する危険性を有していることが示された。

以上、本論文は、インヒビター抵抗性トリプシンアイソフォームの発見、その構造と機能の解析、ならびに生理的意義に関する研究を論述したものである。

## 論文審査の結果の要旨

もっとも代表的なヒト膵臓プロテアーゼであるトリプシンは、膵臓消化酵素群のなかで鍵酵素と呼ぶべき分子であるといえる。膵消化酵素のほとんどは前駆体 (プロ酵素) として合成・分泌され、消化管内でトリプシンによる特異的な限定加水分解によってはじめて活性化されるからである。サザンハイブリダイゼーションによると、ヒトゲノムにはトリプシン遺伝子が少なくとも10コピー存在しているが、このうち遺伝子レベルおよびタンパク質レベルで解析されているのは、トリプシン I 型および II 型の2種類だけである。本論文は、トリプシンの新規アイソフォームを遺伝子レベルから解析することを試み、既知のトリプシンとはアミノ酸配列が一部異なり、特徴的な性状を示す新規アイソフォームを発見することに成功し

たものである。評価できる主要な点は以下のとおりである。

(1) ヒト膵臓 cDNA ライブラリーを系統的にスクリーニングして、新規トリプシンアイソフォーム cDNA をクローニングすることに成功した。その構造を決定することによって、既知のトリプシン I, II とそれぞれ 86, 88% のアミノ酸配列における相同性を示すことを明らかにした。

(2) 新規トリプシンアイソフォーム cDNA を大腸菌ペリプラズムで発現させ、活性を有する組み換え体タンパク質を取得することに成功した。この標品を用いて生化学的特性を詳細に調べたところ、既知のトリプシンを 100% 阻害するに足る濃度のタンパク性トリプシンインヒビターではほとんど阻害されないという興味深い知見を得た。この性質は、既知トリプシンとは際だって異なるものである。

(3) 新規トリプシンアイソフォームとタンパク性トリプシンインヒビターとの分子的相互作用をゲル濾過カラムで調べたところ、両分子は安定な複合体を形成しえないことが確かめられ、これによってインヒビターに抵抗性を示すメカニズムを分子レベルで明らかにすることに成功した。

(4) 新規トリプシンアイソフォームのインヒビター抵抗性は、活性中心近傍に位置する 198 番目の残基が、既知のトリプシンでは Gly であるのに対し、Arg に置換されていることに起因している可能性を、X 線解析データを元にしたコンピュータシミュレーションによって考察した。このことによって新規トリプシンが示すユニークな特性をタンパク質の立体構造レベルで説明する仮説を提出した。

(5) インヒビターに抵抗性を示すトリプシンアイソフォームがモデル動物であるラットの膵臓にも発現していることを見出し、これをクローニングした。組み換え体を調製し、*in vitro* で調べたところ、他のプロ酵素の活性化を促進する効果が認められた。このことから、インヒビターに抵抗性を示すトリプシンアイソフォームは、栄養素の消化に寄与する一方、膵炎のような疾病を促進する危険性もあることを明らかにした。

以上のように、本論文は食品栄養学、酵素化学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成 9 年 2 月 14 日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。